

Характеристика штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*, выделенного из ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.)

* Словарева О.Ю.¹, Авдеев И.С.², Яремко А.Б.³,
Панченко К.В.⁴

^{1,2,3,4} ФГБУ «Всероссийский центр карантина
растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл.,
Россия, 140150

^{1,2} Российский университет дружбы народов
(РУДН), г. Москва, Россия, 117198

¹ ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

² ORCID 0009-0006-9266-7073,
e-mail: avdeefey@mail.ru

³ ORCID 0000-0003-3295-8080,
e-mail: an_ya94@mail.ru

⁴ ORCID 0009-0007-1308-8645,
e-mail: ksushik96@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948 – это фитопатогенная бактерия, вызывающая розовый бактериоз зерна у зерновых и зернобобовых культур, а также различные виды гнилей и другие симптомы у широкого перечня ценных сельскохозяйственных растений, и для полного понимания патогенного потенциала этой бактерии необходимо детально изучить максимально возможное число штаммов. Целью данной работы является создание комплексной характеристики бактериального штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici*, выделенного из ячменя обыкновенного озимого (*Hordeum vulgare* L.), происхождение – Республика Крым. В работе представлены его морфологические свойства, которые были изучены с помощью микроскопии клеток, а также фотографии колоний бактериальных культур на питательной среде R2A. Клетки данного штамма палочковидной формы, их размер 0,8–1,5 мкм в длину, 0,2–0,4 мкм в ширину. Бактериальные колонии штамма VNIKR-B-0035 на среде R2A – беловатого цвета, слизистые, однородные, имеют круглую выпуклую форму, гладкую и блестящую поверхность, непрозрачны, а выработка водорастворимых пигментов отсутствует. Биохимические особенности были изучены набором для идентификации *Enterobacteriaceae* и физиологических сходных бактерий API 20E (Biomerieux, Франция). Бактерии этого штамма способны сбраживать многие виды сахаров, восстанавливают нитриты, не продуцируют аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, уреазу,

Characteristics of the strain VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* isolated from common barley (*Hordeum vulgare* L.)

* Olga Yu. Slovarova¹, Ivan S. Avdeev²,
Anastasia B. Yaremko³, Ksenia V. Panchenko⁴

^{1,2,3,4} All-Russian Plant Quarantine Center
(FGBU “VNIKR”),
Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast,
Russia, 140150

^{1,2} Peoples' Friendship University of
Russia (RUDN University), Moscow,
Russia, 117198

¹ ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

² ORCID 0009-0006-9266-7073,
e-mail: avdeefey@mail.ru

³ ORCID 0000-0003-3295-8080,
e-mail: an_ya94@mail.ru

⁴ ORCID 0009-0007-1308-8645,
e-mail: ksushik96@mail.ru

ABSTRACT

Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948 is a phytopathogenic bacterium that causes pink grain of cereals and legumes, as well as various types of rot and other symptoms in a wide range of valuable agricultural plants, and to fully understand the pathogenic potential of this bacterium, it is necessary to study in detail as many strains as possible. The aim of this work is to create a comprehensive characterization of the bacterial strain VNIKR-B-0035 *E. rhapontici*, isolated from common winter barley (*Hordeum vulgare* L.), origin – Republic of Crimea. The paper presents its morphology studied using cell microscopy, as well as photographs of bacterial colonies cultured on R2A nutrient medium. The cells of this strain are rod-shaped, measuring 0.8–1.5 µm long and 0.2–0.4 µm wide. Bacterial colonies of strain VNIKR-B-0035 on R2A medium are whitish, slimy, and uniform. They have a round, convex shape, a smooth, shiny surface, and are opaque. They do not produce water-soluble pigments. Biochemical characteristics were studied using the API 20E kit for the identification of *Enterobacteriaceae* and physiologically similar bacteria (Biomerieux, France). Bacteria of this strain are capable of fermenting many types of

индол, ацетоин, желатиназу и H_2S , а также не способны утилизировать цитраты. Молекулярно-генетическая характеристика проведена с использованием четырех ПЦР-тестов на различные гены, специфичных для данной фитопатогенной бактерии. Штамм VNIKR-B-0035 идентифицирован с использованием ПЦР-тестов с праймерами TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B и isoRF/isoRR, а также путем секвенирования участка гена *rpoD*. Это первая молекулярно-генетическая идентификация *E. rhapontici* в России. Эта работа подтвердила, что ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) может служить источником изоляции *E. rhapontici*.

Ключевые слова. Коллекция, бактерии, бактериоз зерновых, идентификация, *rpoD*, розовый бактериоз, ПЦР, защита растений, карантин растений.

ВВЕДЕНИЕ



Фитопатогенная бактерия *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 вызывает розовый бактериоз зерна у зерновых (Dutrecq et al., 1990; Roberts, 1974) и зернобобовых культур (Huang et al., 2007; Schroeder et al., 2002), а также различные виды гнили у овощных (Kahala et al., 2012; Wang et al., 2022), плодовых культур (Kotan et al., 2006; Wang et al., 2017), лекарственных (Tharreau et al., 1992) и других хозяйственно-ценных растений (Ramírez-Rojas et al., 2016). Основой для осуществления контроля заболеваний растений, вызываемых фитопатогенами, являются углубленные знания об их биологических и молекулярно-генетических особенностях (Никитинский, Никитинская, 2025). Получение таких знаний требует наличия как можно большего числа штаммов с установленными культурально-морфологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими характеристиками. Штамм VNIKR-B-0035 *E. rhapontici*, был выделен в 2021 г. из растения ячменя обыкновенного озимого (*Hordeum vulgare* L.) сорта Восход (суперэлита) в рамках научно-исследовательской работы ФГБУ «ВНИИКР» и предварительно идентифицирован секвенированием фрагмента гена 16S рНК с использованием праймеров 8UA/519B, о чем сделано краткое упоминание в публикации Мувинги с коллегами (Muvingi et al., 2023). Полученная последовательность участка 16S рНК при Nucleotide BLAST анализе (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показала максимальное сходство (98,77% при 100% покрытии) с образцами *E. rhapontici*. Депонирование штамма в исследовательскую коллекцию научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР» осуществлено по результатам идентификации только по фрагменту 16S рНК, что не позволяет с достаточной степенью достоверности подтвердить видовую принадлежность штамма к *E. rhapontici*.

sugars, reduce nitrites, do not produce arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease, indole, acetoin, gelatinase and H_2S , and are also unable to utilize citrates. Molecular genetic characterization was conducted using four PCR tests for various genes specific to this phytopathogenic bacterium. Strain VNIKR-B-0035 was identified using PCR tests with primers TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, and isoRF/isoRR, as well as by sequencing a portion of the *rpoD* gene. This is the first molecular genetic identification of *E. rhapontici* in Russia. This study confirmed that common barley (*Hordeum vulgare* L.) can serve as a source of *E. rhapontici* isolation.

Key words. Collection, bacteria, cereal bacteriosis, identification, *rpoD*, pink grain of cereals, PCR, plant protection, plant quarantine.

INTRODUCTION

The phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 causes pink grain of cereals (Dutrecq et al., 1990; Roberts, 1974) and legumes (Huang et al., 2007; Schroeder et al., 2002), as well as various types of rot in vegetables (Kahala et al., 2012; Wang et al., 2022), fruit crops (Kotan et al., 2006; Wang et al., 2017), medicinal (Tharreau et al., 1992) and other economically valuable plants (Ramírez-Rojas et al., 2016). The basis for monitoring plant diseases caused by phytopathogens is in-depth knowledge of their biological and molecular genetic characteristics (Nikitinsky, Nikitinskaya, 2025). Obtaining such knowledge requires the availability of as many strains as possible with established cultural, morphological, biochemical, and molecular genetic characteristics. The *E. rhapontici* strain VNIKR-B-0035 was isolated in 2021 from the Voskhod (superelite) variety of common winter barley (*Hordeum vulgare* L.) as part of research at the FGBU "VNIKR". It was preliminarily identified by sequencing a fragment of the 16S rRNA gene using primers 8UA/519B, as briefly mentioned in the publication by Muvingi (Muvingi et al., 2023). The resulting 16S rRNA sequence, when analyzed by Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), showed the highest similarity (98.77% at 100% coverage) to *E. rhapontici* samples. The deposition of the strain in the research collection of the Research and Methodology Department of Bacteriology of FGBU "VNIKR" was carried out based on the identification results only by the 16S rRNA fragment, which does not allow us to confirm with a sufficient degree of certainty the species affiliation of the strain to *E. rhapontici*.

Цель исследования заключалась в идентификации штамма VNIKR-B-0035 с использованием комплекса молекулярно-генетических тестов и в уточнении его культурально-морфологических и биохимических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования являлся штамм VNIKR-B-0035 *E. rhapontici*. Штамм хранится в исследовательской коллекции научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР» в морозильной камере при температуре -80 °C в двух формах: в виде суспензии в 15%-м растворе глицерина и в виде исходной бактериальной культуры на стенке криопробирки.

Чистую культуру штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* использовали для характеристики колоний и клеток бактерии, а также для проведения молекулярно-генетической характеристики с использованием видоспецифичных ПЦР-тестов. Для посева штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* использовали агаризованную питательную среду общего назначения R2A (Reasoner, Geldreich, 1985). Культивирование штамма проводили при температуре 27 °C. Морфологические признаки колоний описывали в соответствии с общепринятыми методами (Практикум по микробиологии, 2005). Фотофиксацию колоний проводили на фотоаппарате (Canon EOS 6D Mark II, Япония), а также с использованием камеры (Canon EOS RP, Япония) в сочетании со стереомикроскопом (Zeiss stereoDiscovery V20, Германия). Фотофиксацию клеток бактерии проводили на голографическом микроскопе HT-X1 (Tomocube, Республика Корея).

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили, используя ПЦР-тесты, перечисленные в табл. 1.

The aim of the study was to identify the VNIKR-B-0035 strain using a set of molecular genetic tests and to clarify its cultural, morphological and biochemical properties.

MATERIALS AND METHODS

The study material was the *E. rhapontici* strain VNIKR-B-0035. The strain is stored in the research collection of the Research and Methodology Department of Bacteriology of FGBU "VNIKR" in a freezer at -80°C in two forms: as a suspension in a 15% glycerol solution and as the original bacterial culture on the wall of the cryotube.

A pure culture of the *E. rhapontici* strain VNIKR-B-0035 was used to characterize bacterial colonies and cells, as well as to conduct molecular genetic characterization using species-specific PCR tests. General-purpose agar nutrient medium R2A (Reasoner and Geldreich, 1985) was used to inoculate the *E. rhapontici* strain VNIKR-B-0035. Cultivation of the strain was carried out at a temperature of 27 °C. The morphological characters of the colonies were described in accordance with generally accepted methods (Practical Guide to Microbiology, 2005). Photographic recording of the colonies was performed using a camera (Canon EOS 6D Mark II, Japan), as well as a camera (Canon EOS RP, Japan) in combination with a stereomicroscope (Zeiss stereoDiscovery V20, Germany). Photographic imaging of bacterial cells was performed using a HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea).

Molecular genetic identification was performed using the PCR tests listed in Table 1.

To confirm the absence of inhibition of the amplification reaction, additional PCR testing with an internal positive control (IPC) was performed according to the method described by Mazurin et al.

Табл. 1. Молекулярно-генетические тесты, использованные для идентификации штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*

Table 1. Molecular genetic tests used to identify the strain VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*

Тест Test	Праймер Primer	Последовательность 5' -3' Sequence 5' -3'	Мишень Aim	Длина ПЦР-продукта Length of PCR product	Источник Source
TSU01/TSU02	TSU01 TSU02	CCCTGAAGCCATCACTTATT AACACACAGCTTCAGGATG	rpoD	466	Tsuji et al., 2020
isoRF/isoR	isoRF isoRR	CCTGCAGTGCCGGGCCAGAT AGTGTGACTGTTGTTTTCAG	NX-5	1600	Thapa et al., 2012
recA_8/recA_8c	recA_8 recA_8c	TTGGGCGTGATATCGAC CACTTTAACGCGGGTCTCA	recA	419	Gehring, Geider, 2012
ERH-1A/ERH-1B	ERH-1A ERH-1B	AGTGGCGGTCTGGTAAAAG AAGCATCTCCAGCCAAGTC	ampC	736	Naas et al., 2004

**rpoD* – фрагмент β-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы; *NX-5* – фрагмент гена сахарозоизомеразы; *recA* – фрагмент гена ДНК-рекомбиназы A; *ampC* – фрагмент гена β-лактамазы класса C.

**rpoD* - a fragment of the β-subunit of bacterial RNA polymerase; *NX-5* - a fragment of the sucrose isomerase gene; *recA* - a fragment of the DNA recombinase A gene; *ampC* - a fragment of the class C β-lactamase gene.

Для подтверждения отсутствия ингибирования реакции амплификации проводили дополнительное ПЦР-тестирование с внутренним положительным контролем (ВПК) согласно методике, описанной Мазуриным с соавторами (Мазурин и др., 2012). Полученные ПЦР-продукты визуализировали путем электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в стандартном трис-боратном (TBE) буфере с окраской красителем бромистым этидием и документировали при помощи системы ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD, США.

В целях повышения достоверности молекулярно-генетической идентификации и подтверждения видовой принадлежности исследуемого штамма была определена последовательность фрагментов гена *rpoD* (Tsuji et al., 2020) с помощью секвенирования по Сэнгеру (Белкин и др., 2021). Полученные нуклеотидные последовательности использовали для поиска гомологичных образцов при помощи программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и выравнивали алгоритмом CLASTAL W в пакете программ BioEdit 7.2.

При изучении биохимических особенностей использовали набор для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек API 20E (Biomérieux, Франция) в соответствии с инструкциями производителя с одним исключением: инкубирование планшетов с микролунками после их инокуляции бактериальной суспензией проводили при 27 °C в течение 24 часов, а не при 36 °C ± 2 °C, поскольку данный штамм не может быть культивирован при температуре выше 30 °C. Тестирование проводили в пятикратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические свойства

В результате анализа 2D-изображений, созданных на голотомографическом микроскопе HT-X1 (Tomocube, Республика Корея), установлено, что клетки штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* имеют форму палочек размером 0,2–0,4 мкм в ширину и 0,8–1,5 мкм в длину (см. рис. 1).

Морфология колоний штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* представлена на рис. 2 (Canon EOS 6D Mark II, Япония) и на рис. 3. (стереомикроскоп Zeiss stereoDiscovery V20, Германия, с камерой Canon EOS RP, Япония).

Морфологические признаки колоний штамма VNIKR-B-0035, описанные в соответствии с общепризнанными методиками (Практикум по микробиологии, 2005), представлены в табл. 2.

В результате проведения ПЦР-тестирования ДНК штамма VNIKR-B-0035 с праймерами TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, isoRF/isoRR и электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле визуализированы фрагменты ожидаемой длины 466 п.о., 736 п.о., 1600 п.о. соответственно (см. рис. 4А, 4Б, 4В). На рис. 4Г у ДНК штамма VNIKR-B-0035 ПЦР-продукты отсутствовали. Наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины 419 п.о. (см. рис. 4Г) у положительного контроля амплификации, а также отсутствие ингибирования ПЦР, подтвержденное получением ПЦР-продукта длиной 714 п.о. у ВПК (см. рис. 5), свидетельствует о корректном прохождении ПЦР.

(Mazurin et al., 2012). The resulting PCR products were visualized by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in a standard Tris-borate (TBE) buffer stained with ethidium bromide dye and documented using the ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD, USA.

To increase the reliability of molecular genetic identification and confirm the species affiliation of the studied strain, the *rpoD* gene fragments (Tsuji et al., 2020) were sequenced using Sanger sequencing (Belkin et al., 2021). The resulting nucleotide sequences were used to search for homologous samples using the BLAST software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and aligned using the CLASTAL W algorithm in the BioEdit 7.2 software package.

For the study of biochemical characteristics, the API 20E kit for the identification of *Enterobacteriaceae* and other unfastidious gram-negative rods (Biomérieux, France) was used in accordance with the manufacturer's instructions, with one exception: incubation of microwell plates after their inoculation with a bacterial suspension was carried out at 27 °C for 24 hours, and not at 36 °C ± 2 °C, since this strain cannot be cultivated at temperatures above 30 °C. Testing was carried out in 5 replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology

As a result of the analysis of 2D images created on the HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea), it was established that the cells of the VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain are rod-shaped, 0.2–0.4 μm in width and 0.8–1.5 μm long (see Fig. 1).

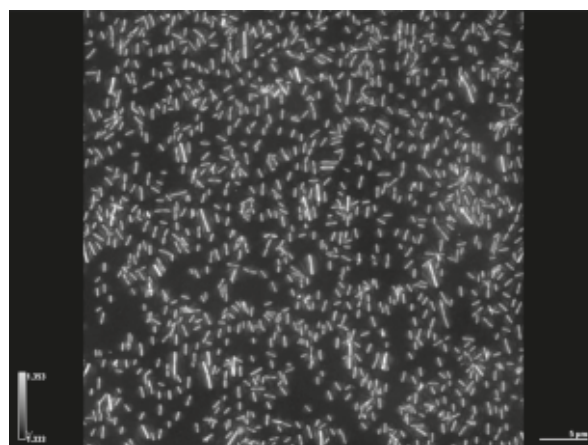


Рис. 1. 2D-изображение бактериальных клеток штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*, сделанное на голотомографическом микроскопе HT-X1 (Tomocube, Республика Корея)

Fig. 1. 2D image of bacterial cells of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain taken on an HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea)

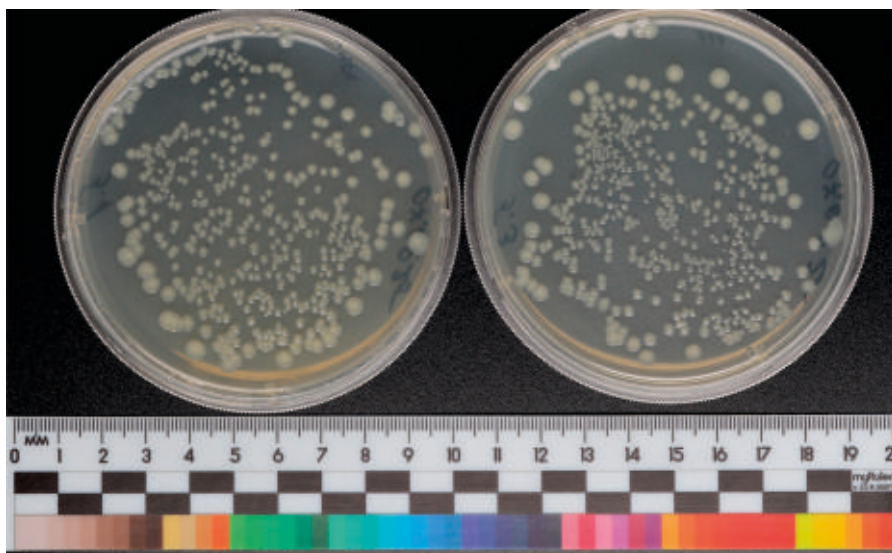


Рис. 2. Колонии штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* спустя четверо суток инкубирования при 27 °C на среде R2A

Fig. 2. Colonies of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain after four days of incubation at 27 °C on R2A medium



Рис. 3. Колонии штамма *Erwinia rhapontici* VNIKR-B-0035 спустя четверо суток инкубирования при температуре 27 °C на среде R2A

Fig. 3. Colonies of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain after four days of incubation at 27 °C on R2A medium

Полученный результат может указывать на недостаточную комплементарность генетической мишени праймеров *recA_8/recA_8c* у штамма VNIKR-B-0035.

При выравнивании в Nucleotide BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) последовательности, полученной в ходе секвенирования участка гена *rpoD*, она имела максимальное сходство с геном референтного штамма *E. rhapontici* BY21311 (полногеномная последовательность GCA_020683125.1) с идентичностью 97,84% (покрытие 100%). Полученные результаты молекулярно-генетической идентификации подтверждают видовую принадлежность штамма VNIKR-B-0035 к виду *E. rhapontici*.

Биохимические свойства

Результаты биохимического тестирования набором API 20E после 24 часов инкубирования

The morphology of the colonies of the VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain is shown in Fig. 2 (Canon EOS 6D Mark II, Japan) and in Fig. 3 (Zeiss stereo-Discovery V20 stereo microscope, Germany, with a Canon EOSRP camera, Japan).

The morphological characteristics of the colonies of strain VNIKR-B-0035, described in accordance with generally accepted methods (Microbiology Workshop, 2005), are presented in Table 2.

Molecular genetic identification

The results of molecular genetic identification are presented in Fig. 4.

As a result of PCR testing of DNA of strain VNIKR-B-0035 with primers TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, *isoRF/isoRR* and electrophoresis of PCR products in agarose gel, fragments of the expected lengths of 466 bp, 736 bp, 1600 bp, respectively, were visualized (see Fig. 4A, 4B, 4C). In Fig. 4D, PCR products were absent from DNA of strain VNIKR-B-0035. The presence of a PCR product of the expected length of 419 bp (see Fig. 4D) in the positive amplification control, as well as the absence of PCR inhibition, confirmed by obtaining a PCR product of 714 bp in length for IPC (see Fig. 5), indicates that the PCR was performed correctly.

The obtained result may indicate insufficient complementarity of the genetic target of

recA_8/recA_8c primers in the VNIKR-B-0035 strain.

When aligned in NCBI Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with the sequence obtained during sequencing of the *rpoD* gene region, it had the highest similarity to the gene of the reference strain *E. rhapontici* BY21311 (whole genome sequence GCA_020683125.1) with an identity of 97.84% (100% coverage). The obtained results of molecular genetic identification confirm the species affiliation of strain VNIKR-B-0035 to the species *E. rhapontici*.

Biochemical properties

The results of biochemical testing with the API 20E kit after 24 hours of incubation of microwell plates at 27 °C are shown in Fig. 6.

Табл. 2. Морфологические признаки колоний штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* спустя трое–четверо суток инкубирования на среде R2A

Table 2. Morphological characteristics of colonies of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain after three to four days of incubation on R2A medium

Признак Aspects	Свойства VNIKR-B-0035 VNIKR-B-0035 properties	Свойства типового штамма DSM 4484* Properties of the type strain DSM 4484*
Форма Shape	Круглая Round	Круглая Round
Размер Size	До 10 мм Up to 10 mm	До 10 мм Up to 10 mm
Поверхность Surface	Гладкая Smooth	Гладкая Smooth
Профиль Profile	Выпуклый Convex	Выпуклый Convex
Блеск Brilliance	Блестящая Shiny	Блестящая Shiny
Прозрачность Transparency	Непрозрачная Opaque	Непрозрачная Opaque
Цвет Color	Беловатый Whitish	Беловатый Whitish
Пигментация среды Medium Pigmentation	Отсутствует Absent	Отсутствует/розовый Absent/Pink
Край Edge	Гладкий Smooth	Гладкий Smooth
Структура Structure	Однородная Homogeneous	Однородная Homogeneous
Консистенция Consistency	Слизистая Mucous	Слизистая Mucous

*по описанию вида

*according to the species description

Молекулярно-генетическая идентификация

Результаты молекулярно-генетической идентификации представлены на рис. 4.

Molecular genetic identification

The results of molecular genetic identification are presented in Fig. 4.

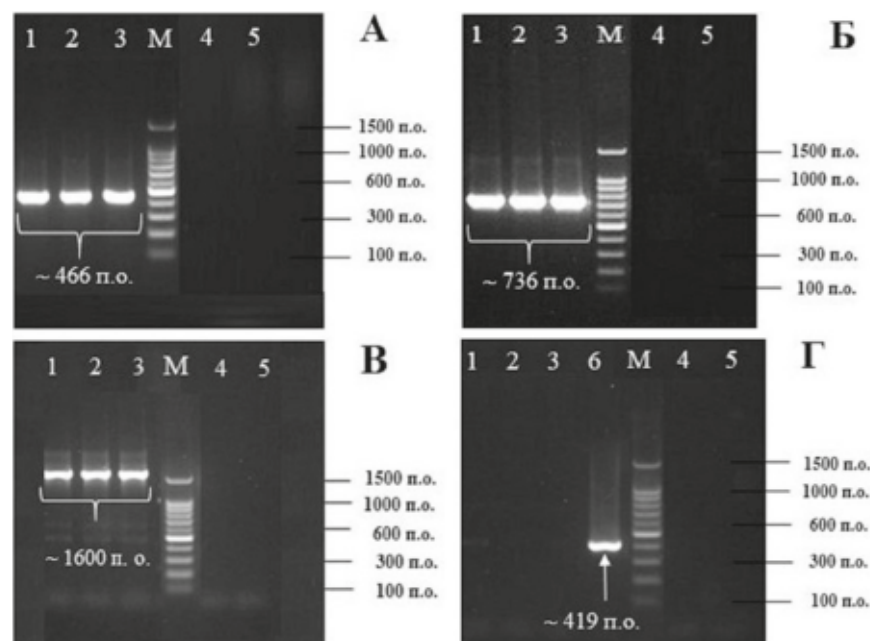


Рис. 4. Электрофореграмма результатов тестов ПЦР с ДНК штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* (дорожки 1–3), где А – тест TSU01/TSU02, Б – тест ERH-1A/ ERH-1B, В – тест isoRF/isoRR, Г – тест recA_8/recA_8c, 4–5 – отрицательный контроль амплификации, 6 – положительный контроль амплификации, М – маркер длин ДНК 100+ bp, «Евроген» (Россия)

Fig. 4. Electropherogram of the PCR tests results with DNA of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain (tracks 1–3), where A is the TSU01/TSU02 test, B is the ERH-1A/ERH-1B test, C is the isoRF/isoRR test, G is the recA_8/recA_8c test, 4–5 are negative amplification controls, 6 are positive amplification controls, M is a DNA length marker of 100+ bp, Evrogen (Russia)

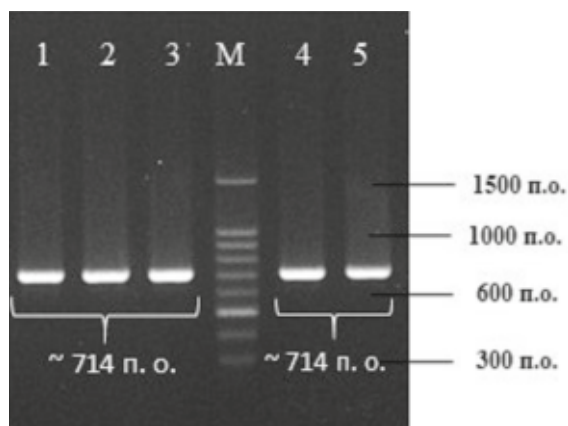


Рис. 5. Электрофореграмма результатов теста Mus 714 R/F, где дорожки 1–3 – ДНК штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*, 4–5 – отрицательный контроль амплификации, М – маркер длин ДНК 100+ bp, «Евроген»

Fig. 5. Electropherogram of the Mus 714 R/F test results, where tracks 1–3 are DNA of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain, 4–5 are negative amplification control, M is a DNA length marker of 100+ bp, “Eurogen”

планшетов с микролунками при температуре 27 °C представлены на рис. 6.

Установлено, что бактерии штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* вырабатывают ферменты β-галактозидазу и триптофандеаминазу, могут сбраживать глюкозу, маннит, инозит, сорбит, рамнозу, сахарозу, мелибиозу, амигдалин, арабинозу, восстанавливают нитраты до нитритов. Они не продуцируют аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, уреазу, индол, ацетоин, желатиназу и H₂S, а также не способны утилизировать цитраты. Типовой штамм *E. rhapontici* DSM 4484^T не вырабатывает ферменты β-галактозидазу, триптофандеаминазу, не сбраживает сорбит, продуцирует ацетоин и утилизует цитраты (Schober et al., 2025). Таким образом, штамм VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* обладает уникальными биохимическими характеристиками по сравнению с типовым штаммом этого вида.

В результате проведенной характеристики составлена карточка штамма, содержащая ключевую информацию о его происхождении и основных свойствах (см. табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были определены культурально-морфологические особенности исследуемого штамма. С помощью голотомографического микроскопа HT-X1 (Tomocube, Республика Корея) мы установили, что клетки штамма VNIKR-B-0035 имеют палочковидную форму, их размер 0,8–1,5 мкм в длину и 0,2–0,4 мкм в ширину. При культивировании бактерии на агаризованной среде R2A вырастают слизистые, однородные, круглой выпуклой формы, с гладкой и блестящей поверхностью колонии, они непрозрачны и не вырабатывают водорастворимых пигментов.

С помощью использования набора для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек API 20E (Biomerieux, Франция) установлено, что



Рис. 6. Результаты биохимического тестирования штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* набором для идентификации *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных бактерий API 20E (Biomerieux, Франция)

Fig. 6. Results of biochemical testing of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain using the API 20E kit for identification of *Enterobacteriaceae* and other gram-negative bacteria (Biomerieux, France)

It has been established that the VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain produces the enzymes β-galactosidase and tryptophan deaminase and can ferment glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin, and arabionose, and reduce nitrates to nitrites. They do not produce arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease, indole, acetoin, gelatinase, or H₂S, and are unable to utilize citrates. The type strain of *E. rhapontici* DSM 4484^T does not produce the enzymes β-galactosidase and tryptophan deaminase, does not ferment sorbitol, produces acetoin, and utilizes citrates (Schober et al., 2025). Thus, the VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain has unique biochemical characteristics compared to the type strain of this species.

As a result of the conducted characterization, a strain profile was compiled containing key information about its origin and main properties (see Table 3).

CONCLUSION

As a result of the study, the cultural and morphological characteristics of the studied strain were determined. Using an HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea), we found that the cells of the VNIKR-B-0035 strain are rod-shaped, measuring 0.8–1.5 μm in length and 0.2–0.4 μm in width. When cultivated on R2A agar medium, the bacteria produce slimy, uniform, round, convex colonies with a smooth and shiny surface. They are opaque and do not produce water-soluble pigments.

Using the API 20E (Biomerieux, France) kit for identification of *Enterobacteriaceae* and other unpretentious gram-negative rods, it was established that the bacteria of the VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain have noticeable differences from the type strain DSM 4484^T in the profile of the synthesized enzymes.

Табл. 3. Карточка штамма VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*
Table 3. Profile of the VNIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain

Название коллекции, в которой депонирован штамм Name of the collection in which the strain is deposited	Научная коллекция бактерий научно-методического отдела бактериологии Scientific collection of bacteria of the Research and Methodology Department of Bacteriology
Адрес коллекции Collection address	МО, м. о. Раменский, пгт Быково, ул. Пограничная, 32, 140150 Moscow Oblast, Ramenskoye, Bykovo, 32 Pogranichnaya, 140150
Дата введения в коллекцию Date of introduction into the collection	01.06.2021
Номер штамма Strain number	VNIKR-B-0035
Научное название организма Scientific name of the organism	<i>Erwinia rhapontici</i> (Millard 1924) Burkholder 1948
Географическое происхождение Geographical origin	Россия, Республика Крым, Белогорский район Russia, Republic of Crimea, Belogorsky District
Типовой штамм Type strain	☐ Да Yes ☒ Нет No
Источник изоляции Source of isolation	Ячмень обыкновенный озимый, сорт Восход (суперэлита), <i>Hordeum vulgare</i> L. Common winter barley, Voskhod variety (super elite), <i>Hordeum vulgare</i> L.
Ф. И. О. лица, производшего выделение штамма Full name of the person who isolated the strain	Словарева О. Ю. Slovareva O. Yu.
Год изоляции Year of isolation	2021
Проведенные методы идентификации Identification methods used	Секвенирование участков 16S рРНК (праймеры 8UA/519B) и участок гена <i>rpoD</i> (праймеры TSU01/TSU02), ПЦР-тестирование с праймерами TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004) и isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012) Sequencing of 16S rRNA regions (primers 8UA/519B) and the <i>rpoD</i> gene region (primers TSU01/TSU02), PCR testing with primers TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004) and isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012)

бактерии штамма VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* имеют заметные отличия от типового штамма DSM 4484^T по профилю синтезируемых ферментов.

При ПЦР-тестировании ДНК VNIKR-B-0035 *E. rhapontici* с праймерами recA_8/recA_8c (Gehring, Geider, 2012) ПЦР-продукты отсутствовали, что свидетельствует о недостаточной комплементарности генетической мишени праймеров recA_8/recA_8c у штамма VNIKR-B-0035. В результате проведения других видоспецифичных ПЦР-тестов исследуемого штамма с праймерами TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004) и isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012) получены продукты ожидаемой длины 466 п.о., 736 п.о., 1600 п.о. соответственно. Секвенирование участка гена *rpoD* также указывает на принадлежность штамма VNIKR-B-0035 к виду *E. rhapontici*.

Это первая молекулярно-генетическая идентификация *E. rhapontici* в России, проведенная с использованием видоспецифичных праймеров TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B и isoRF/isoRR, а также путем секвенирования участка *rpoD*. Полученные результаты подтверждают принадлежность штамма VNIKR-B-0035 к виду *E. rhapontici*. Ранее, насколько нам известно, отсутствовали достоверные сведения о том, что ячмень может быть источником изоляции *E. rhapontici*. Упоминание об изоляции бактерии рода *Erwinia* из ячменя двурядного (*Hordeum vulgare* L. var. *distichon*) размещено на сайте Научно-

PCR testing of *E. rhapontici* VNIKR-B-0035 DNA with recA_8/recA_8c primers (Gehring, Geider, 2012) did not yield any PCR products, indicating insufficient complementarity of the recA_8/recA_8c primer genetic target in strain VNIKR-B-0035. Other species-specific PCR tests of the strain under study with TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004), and isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012) primers yielded products of the expected lengths of 466 bp, 736 bp, and 1600 bp, respectively. Sequencing of the *rpoD* gene region also indicates that strain VNIKR-B-0035 belongs to the species *E. rhapontici*.

This is the first molecular genetic identification of *E. rhapontici* in Russia, conducted using the species-specific primers TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, and isoRF/isoRR, as well as by sequencing the *rpoD* region. The results confirm that strain VNIKR-B-0035 belongs to the species *E. rhapontici*. As far as we know, previously there was no reliable information that barley could be a source of *E. rhapontici* isolation. A mention of the isolation of a bacterium of the genus *Erwinia* from the barley (*Hordeum vulgare* L. var. *distichon*) was posted on the website of the Research Center for Genetic Resources of the National Organization for Agricultural and Food Research, where, based on a study of the 650 bp *gyrB* gene sequence, the bacterium was identified as *E. rhapontici* (NARO

исследовательского центра генетических ресурсов Национальной организации сельскохозяйственных и продовольственных исследований, где на основании исследования последовательности гена *gyrB* длиной 650 п.о. бактерию идентифицировали как *E. rhapontici* (NARO Genebank project). Учитывая, что выравнивание этой последовательности в Nucleotide BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) не позволяет установить максимальное сходство именно с *E. rhapontici*, поскольку использованная последовательность гена *gyrB* консервативна с другим видом *E. persicina*, сообщение в NARO Genebank project нельзя считать достоверным до получения дополнительных сведений. Таким образом, наше исследование является первым подтверждением того, что *E. rhapontici* может быть выделена из ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.).

Работа выполнена в рамках государственного задания, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 124022800050-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белкин Д.Л., Бондаренко Г.Н., Яремко А.Б., Уварова Д.А. Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов // Карантин растений. Наука и практика. 2019. Т. 28. № 2. С. 31–34.
2. Мазурин Е.С., Копина М.Б., Шероколава Н.А. Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2012. № 3. С. 31–37.
3. Никитинский Д.А., Никитинская Е.В. Молекулярно-генетические методы, применяемые для детекции карантинных объектов. Инновации, вызовы и перспективы. Фитосанитария. Карантин растений. 2025; (3): 85–107. <https://doi.org/10.69536/FKR.2025.67.86.006>.
4. Dutrecq A., Debras P., Stevaux J., Klaessens D. Estimation of bacterial flora on scalded wheat heads // Parasitica. 1990. T. 2-3. No. 46. P. 69–84.
5. Gehring I., Geider K. Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR. // Journal of Microbiological Methods. 2012. Vol. 89. No. 1. P. 57–62. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.018.
6. Genebank project, NARO. Details of microorganism genetic resources. Details of MAFF 150529. URL: https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_detail_en.php?maff=150529.
7. Huang H. C., Erickson R. S., Hsieh T. F. Lack of host specificity of strains of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed of pulse and cereal crops // Botanical Studies. 2007. Vol. 48. No. 2. P. 181–186.
8. Kahala M., Blasco L., Joutsjoki V. Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot // Journal of Food Protection. 2012. Vol. 75. No. 3. P. 523–532. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-185.
9. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey // Journal of Plant Diseases and Protection. 2006. Vol. 113. No. 1. P. 8–13.
10. Muvingi M., Slovareva O.Y., Yaremko A.B., Genebank project). Given that alignment of this sequence in NCBI Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) does not allow us to establish maximum similarity specifically to *E. rhapontici*, as the *gyrB* gene sequence used is conserved with another species, *E. persicina*, the report in the NARO Genebank project cannot be considered reliable until additional information is obtained. Thus, our study is the first confirmation that *E. rhapontici* can be isolated from common barley (*Hordeum vulgare* L.).

The work was carried out within the framework of a state assignment, registration number EGISU R&D 124022800050-6.

REFERENCES

1. Belkin D.L., Bondarenko G.N., Yaremko A.B., Uvarova D.A. Sequencing method in species identification of quarantine pests [Metod sekvenirovaniya v vidovoy identifikatsii karantinnykh vrednykh organizmov] // Plant Health. Research and Practice. 2019; 28(2): 31–34.
2. Mazurin E.S., Kopina M.B., Sherokolava N.A. Control of the reliability of the results of phytosanitary examination using molecular diagnostic methods [Kontrol dostovernosti rezultatov fitosanitarnoy ekspertizy pri ispolzovanii molekulyarnykh metodov diagnostiki] // Bulletin of RUDN. Series: Agronomy and Animal Husbandry. 2012; 3: 31–37. (In Russ.)
3. Nikitinsky D.A., Nikitinskaya E.V. Molecular genetic methods used for detection of quarantine objects. Innovations, challenges and prospects. Plant Health and Quarantine. 2025; (3): 85–107. <https://doi.org/10.69536/FKR.2025.67.86.006>.
4. Dutrecq A., Debras P., Stevaux J., Klaessens D. Estimation of bacterial flora on scalded wheat heads // Parasitica. 1990. T. 2-3. No. 46. P. 69–84.
5. Gehring I., Geider K. Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR. // Journal of Microbiological Methods. 2012. Vol. 89. No. 1. P. 57–62. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.018.
6. Genebank project, NARO. Details of microorganism genetic resources. Details of MAFF 150529. URL: https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_detail_en.php?maff=150529.
7. Huang H. C., Erickson R. S., Hsieh T. F. Lack of host specificity of strains of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed of pulse and cereal crops // Botanical Studies. 2007. Vol. 48. No. 2. P. 181–186.
8. Kahala M., Blasco L., Joutsjoki V. Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot // Journal of Food Protection. 2012. Vol. 75. No. 3. P. 523–532. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-185.
9. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey // Journal of Plant Diseases and Protection. 2006. Vol. 113. No. 1. P. 8–13.

Zargar M., Lyashko, M., Pakina E., Vvedenskiy V. Variations of the Bacterial Community in Wheat (*Triticum aestivum*), Oats (*Avena sativa* L.), Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Triticale (*Triticosecale*) from Three Regions of the Republic of Crimea // Preprints. 2023. doi: 10.20944/preprints202307.1559.v1.

11. Naas T., Aubert D., Vimont S., Nordmann P. Identification of a chromosome-borne class C beta-lactamase from *Erwinia rhapontici* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004. Vol. 54. No. 5. P. 932–935. doi: 10.1093/jac/dkh446.

12. Ramírez-Rojas S., Osuna-Canizalez F.J., García-Pérez F., Canul-Ku J., Palacios-Talavera A., Hernández-Romano J., Ornelas-Ocampo K., Landa-Salgado P. Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained in vitro // Revista Mexicana de Fitopatología. 2016. Vol. 34. No. 2. P. 173–183. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1511-3.

13. Reasoner D.J., Geldreich E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49. No. 1. P. 1–7. doi: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

14. Schober I., Koblit J., Carbasse J.S., Ebeling C., Schmidt M.L., Podstawka A., Gupta R., Ilangovan V., Chamanara J., Overmann J., Reimer L.C., BacDive in 2025: the core database for prokaryotic strain data, Nucleic Acids Research, 2025. Vol. 53. Issue D1. P. D748–D756. doi: 10.1093/nar/gkae959.

15. Thapa S. P. Cho S. Y., Hur J. H., Lim C. K. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia rhapontici* isolated from diseased Asian pear fruit trees // Phytoparasitica. 2012. Vol. 40. No. 5. P. 507–514. doi: 10.1007/s12600-012-0251-3.

16. Tharreau D., Gagnard J. L., Luisetti J., Gibbon C. B. Presence d'une microflore bacterienne abondante et variee a la surface de trois plantes aromatiques et medicinales. Herba Gallica., 1992. No. 2. 79–89.

17. Tsuji M., Kadota I., Takikawa Y. Genetic and phenotypic characterization of bacterial strains isolated in Japan that resemble *Erwinia rhapontici* and *E. persicinus* // Journal of General Plant Pathology. 2020. Vol. 86. No. 1. P. 24–33. doi: 10.1007/s10327-019-00873-7.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Словарева Ольга Юрьевна, старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; доцент базовой кафедры фитосанитарной биологии и безопасности экосистем института экологии, РУДН, г. Москва, Россия;
ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Авдеев Иван Сергеевич, младший научный сотрудник научно-методического отдела бактериологии, ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; студент института экологии, РУДН, г. Москва, Россия;
ORCID 0009-0006-9266-7073,
e-mail: avdeevfey@mail.ru

10. Muvingi M., Slovareva O.Y., Yaremko A.B., Zargar M., Lyashko, M., Pakina E., Vvedenskiy V. Variations of the Bacterial Community in Wheat (*Triticum aestivum*), Oats (*Avena sativa* L.), Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Triticale (*Triticosecale*) from Three Regions of the Republic of Crimea // Preprints. 2023. doi: 10.20944/preprints202307.1559.v1.

11. Naas T., Aubert D., Vimont S., Nordmann P. Identification of a chromosome-borne class C beta-lactamase from *Erwinia rhapontici* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004. Vol. 54. No. 5. P. 932–935. doi: 10.1093/jac/dkh446.

12. Ramírez-Rojas S., Osuna-Canizalez F.J., García-Pérez F., Canul-Ku J., Palacios-Talavera A., Hernández-Romano J., Ornelas-Ocampo K., Landa-Salgado P. Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained in vitro // Revista Mexicana de Fitopatología. 2016. Vol. 34. No. 2. P. 173–183. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1511-3.

13. Reasoner D.J., Geldreich E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49. No. 1. P. 1–7. doi: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

14. Schober I., Koblit J., Carbasse J.S., Ebeling C., Schmidt M.L., Podstawka A., Gupta R., Ilangovan V., Chamanara J., Overmann J., Reimer L.C., BacDive in 2025: the core database for prokaryotic strain data, Nucleic Acids Research, 2025. Vol. 53. Issue D1. P. D748–D756. doi: 10.1093/nar/gkae959.

15. Thapa S. P. Cho S. Y., Hur J. H., Lim C. K. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia rhapontici* isolated from diseased Asian pear fruit trees // Phytoparasitica. 2012. Vol. 40. No. 5. P. 507–514. doi: 10.1007/s12600-012-0251-3.

16. Tharreau D., Gagnard J. L., Luisetti J., Gibbon C. B. Presence d'une microflore bacterienne abondante et variee a la surface de trois plantes aromatiques et medicinales. Herba Gallica., 1992. No. 2. 79–89.

17. Tsuji M., Kadota I., Takikawa Y. Genetic and phenotypic characterization of bacterial strains isolated in Japan that resemble *Erwinia rhapontici* and *E. persicinus* // Journal of General Plant Pathology. 2020. Vol. 86. No. 1. P. 24–33. doi: 10.1007/s10327-019-00873-7.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga Slovareva, Senior Researcher – Head of Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Associate Professor of the Basic Department of Phytosanitary Biology and Ecosystem Safety, Institute of Ecology, RUDN University, Moscow, Russia;
ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Ivan Avdeev, Junior Researcher, Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; student at the Institute of Ecology, RUDN University, Moscow, Russia;
ORCID 0009-0006-9266-7073,
e-mail: avdeevfey@mail.ru